

## ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ГОРМОНАЛЬНОГО РЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСУ ТА КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ГЛУТАТІОНУ ПРИ РАКУ ЯЄЧНИКІВ\*

Фартушок Т. В.<sup>1</sup>, Фартушок Н. В.<sup>2</sup>, Беседін О. В.<sup>1</sup>, Ісаєва К. Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,  
м. Львів, Україна;

<sup>2</sup> Львівський медичний інститут, м. Львів, Україна  
[fartushok1@ukr.net](mailto:fartushok1@ukr.net)

Рак яєчників (РЯ) займає восьме місце за захворюваністю в структурі жіночої онкопатології [1]. Серед причин смертності РЯ посідає сьоме місце серед усіх онкозахворювань. В Україні смертність від РЯ складає 9,4 на 100 тис. жіночого населення. Щорічно в Україні помирає 24,6% жінок з вперше виявленим РЯ. В індустріально розвинених країнах спостерігається високий відсоток захворюваності, що свідчить про вплив зовнішнього середовища.

Низька виживаність таких пацієнток обумовлена безсимптомним перебігом на ранніх стадіях та відсутністю патогномічних симптомів. Поява збільшення індексу маси тіла при зовнішніх ознаках кахексії, збільшення об'єму живота, наростання задишки, тахікардія, слабкість, стомлюваність, блідість заставляють пацієнток звертатись до ендокринолога.

Сполука платини є одним із найпотужніших хіміотерапевтичних препаратів, які широко застосовуються при РЯ [2]. Хоча РЯ, як правило, чутливий до хіміотерапії, у більшості пацієнтів виникають рецидиви і розвивається резистентність до хіміотерапії [3]. Рівень виживаності оцінюється на основі попередніх результатів [4], але нелегко передбачити, що станеться з пацієнтками з РЯ. Глутатіон — внутрішньоклітинний антиоксидант, який запобігає пошкодженням активними формами кисню (АФК) [8, 9]. Останні відіграють важливу роль у розвитку клітинного циклу та шляху клітинної смерті. Ерастин є класичним інгібітором, який може призводити до виснаження пулу глутатіону [5]. У цьому дослідженні ми зосередилися на потенціалі глутатіону як нового прогностичного біомаркера та ерастину як нової стратегії про-

\* Роботу виконано в межах НДР кафедри акушерства та гінекології ЛНМУ імені Данила Галицького «Удосконалення профілактики інтранатального пошкодження плода при аномаліях скоротливої діяльності матки» (№ держреєстрації 0122U000166).

Установою, що фінансує дослідження, є МОН України.

Автори гарантують повну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів і власної фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 21.11.2022.

типухлинної терапії раку яєчників. Метою дослідження стала оцінка клінічного значення тканинного глутатіону і ефекти ерастину (інгібітора синтезу глутатіону) при ра-

ку яєчників поряд з оцінкою залежності експресії рецепторів стероїдних гормонів від ступеня злоякісності раку яєчників.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджено 41 зразок тканини РЯ від пацієнток, які перенесли операцію між 2009 і 2018 роками в онкогінекологічному відділенні № 1 Львівського онкологічного регіонального лікувально-діагностичного центру м. Львів (табл. 1).

Зразки РЯ були піддані гістологічному дослідженню 2 експертами-патологами для підтвердження класифікації пухлини згідно Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) і визначення стадії за системою пухлина-вузол-метастаз (TNM). Комісія з біоетики ЛНМУ ім. Данила Галицького схвалила експерименти. Письмова інформована згода була отримана від усіх пацієнток.

### Імуногістохімічні дослідження експресії білків

Імуногістохімічні дослідження експресії білків проводили на паралельних зрізах з використанням моноклональних антитіл: рецептори естрогенів (РЕ) — клон 1D5, прогестерону (РП) — клон РgR636. Систему EnVision («DakoCytomation», Данія) використовували для візуалізації білків.

У кожному препараті аналізували по 1000 пухлинних клітин. Клітини з по-

зитивною імуногістохімічною реакцією визначали як індекс мітки (ІМ) і виражали у відсотках. Експресія рецепторів естрогенів та прогестерону визначалась за специфічним ядерним забарвленням. Якщо  $ІМ < 10\%$ , то в таких випадках пухлина вважалась негативною за експресією рецепторів стероїдних гормонів. Також визначались медіани (Ме) показників експресії. Якщо значення ІМ менші Ме, то експресію білка вважали низькою, а якщо значення ІМ більші Ме, то експресію білка вважали високою.

### Визначення глутатіону у тканинах раку яєчників людини

Для визначення глутатіону використовували зразок, отриманий шляхом заморожування відокремленої тканини. Брالی центральні та глибокі тканини РЯ як зразки у пацієнтки під час операції. Тканини лізували в 5% дигідраті 5-сульфосаліцилової кислоти (Wako Pure Chemical Industries). Лізат центрифугували (1000 об./хв) і збирали супернатант. Супернатант використовували для визначення кількості глутатіону

Таблиця 1

### Епідеміологічні фактори раку яєчників в обстежених жінок

Фактор	Кількість жінок	
	Абс.	%
Вік		
45–50	5	12
51–55	8	20
56–60	12	29
61–67	16	39
Раннє менархе	32	78
Менопауза після 52 років	9	22
Рак молочної залози в анамнезі	4	10
Нульовий паритет	8	20
Не приймали оральних контрацептивів	34	83
Отримували ЗГТ $\geq 5$ років	26	63
Паління сигарет	11	27
Ожиріння	18	44

у зразку. Використовували набір GSH і GSSG Assay Kit (продукт № S0053, Beyotime) для визначення рівнів глутатіону. Буфер для аналізу глутатіону, глутатіон-редуктазу, розчин 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойної кислоти та зразок супернатанту змішували разом та інкубували при 25°C протягом 5 хвилин, потім до цієї системи додавали НАДФ для запуску реакції. Збільшення поглинання 5-тіо-2-нітробензойної кислоти вимірювали при 412 нм, і рівні глутатіону розраховували відповідно до інструкцій до продукту.

#### *Культура клітин*

Для дослідження були використані клітини світлоклітинного раку, високо- та низькодиференційованої серозної карциноми, а також ендометріюїдної та муцинозної карциноми. Ці клітини культивували в модифікованому середовищі Дульбекко (Wako), що містило 10% фетальної бичачої сироватки і 1% пеніциліну/стрептоміцину під 5% CO<sub>2</sub> при 37°C [9].

*Медикаментозна обробка.* Обробку клітин ерастином, інгібітором синтезу глутатіону, проводили в модифікованому середовищі Дульбекко, що містило 10% фетальної бичачої сироватки і 1% пеніциліну/стрептоміцину.

#### *Аналіз*

##### *життєздатності клітин*

Життєздатність клітин оцінювали за допомогою системи аналізу проліферації клітин Premix WST-1 (TaKaRa Bio Incorporated) відповідно до інструкцій виробника. Клітини (1×10<sup>4</sup> клітин/лунка) висівали в 96-лунковий планшет і обробляли досліджуваними препаратами в різних концентраціях протягом зазначеного часу. Після додавання 10 мкл попереднього розчину WST-1 до кожної лунки клітини інкубували при 37°C протягом ще 1 години та визначали поглинання при 440 нм за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів.

##### *Аналіз внутрішньоклітинного глутатіону*

Клітини поміщали в 6-лункові планшети з щільністю 3,0×10<sup>5</sup> клітин/лунка і куль-

тивували протягом ночі. Клітини отримували різну обробку протягом 4 годин з подальшим збором для визначення кількості клітин. Майже 6×10<sup>4</sup> живих клітин з кожного зразка переносили в нові пробірки, промивали у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) і центрифугували при 1200 об./хв при 4°C протягом 5 хвилин двічі. Клітинний осад ресуспендували у 80 мкл розчину для видалення білка, ретельно перемішували та поміщали при -70°C і 37°C послідовно для швидкого заморожування та відтавання, потім поміщали при 4°C на 5 хвилин і центрифугували при 10000 об./хв протягом 10 хвилин. Супернатант використовували для визначення кількості глутатіону у зразку. Використовували набір GSH і GSSG Assay Kit згідно інструкцій для визначення рівнів глутатіону.

##### *Аналіз продукції активних форм кисню (АФК)*

Клітини поміщали в чашки розміром 10 см із щільністю 1,0×10<sup>5</sup> клітин/лунка та культивували протягом ночі. Після обробки досліджуваними сполуками протягом 15 годин збирали в 5 мл модифікованого середовища, що містить реагент темно-червоного кольору (5 мкМ) та інкубували протягом 30 хвилин при 37°C в інкубаторі для тканинних культур. Після трипсинізації клітини ресуспендували в 3% FBS у PBS і проціджували через 40 мкм клітинний фільтр (BD Falcon). Клітини аналізували за допомогою проточного цитометра (FACS Aria, BD Biosciences), оснащеного лазером 488 нм для збудження. Дані збирали з реагенту темно-червоного кольору. Клітини аналізували за умови мінімум 1,0×10<sup>4</sup> клітин.

Дані виражені як середнє значення ± SD з незалежних експериментів. Критерій Стьюдента застосували для міжгрупового порівняння. Для кореляційного аналізу використали критерій Пірсона. Криві виживання будували за допомогою графіків Каплана-Мейера. Результати представлені за допомогою логарифмічного рангового критерію. Багатофакторну пропорційну регресійну модель ризику Кокса використали

для виявлення незалежного фактора, що впливає на прогноз пацієнтів з РЯ. Усі тес-

ти були двосторонніми, і значення  $P < 0,05$  вважалися статистично значущими.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз рецепторного фенотипу в ракових клітинах яєчників показав, що більшість пухлин (56,5%) мали позитивний варіант рецепторного фенотипу (ER+PR+). Негативний рецепторний фенотип (ER-PR-) було виявлено у 18,8% випадків, 11,8% випадків — фенотип ER+PR- і 12,9% характеризувались фенотипом ER-PR+ (рис. 1). Було встановлено прямий кореляційний зв'язок між ІМ РЕ і РП ( $r = +0,5$ ,  $P < 0,03$ ). Експресія РЕ $\alpha$  в пухлинах яєчника складала ( $28,9 \pm 0,7$ )% (при Ме = 31%), а РП — ( $34,5 \pm 0,6$ )% (при Ме = 35%) (табл. 2). Пухлини з низькою експресією РЕ та РП ( $< Me$ ) склали відповідно 19,8% та 17,8%, а високу експресію обох рецепторів визначали у більшій кількості пухлин (56,5%).

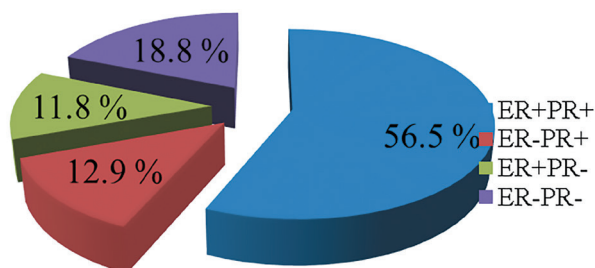


Рис. 1. Характеристика рецепторного фенотипу карцином яєчника.

При співставленні експресії рецепторів стероїдних гормонів зі ступенем злоякісності було виявлено, що у пухлинах низького ступеня злоякісності спостерігається більша кількість клітин з експресією рецепторів до естрогенів порівняно з пухлинами високого ступеня злоякісності (табл. 2).

Визначили рівні глутатіону у 41 зразку ракової тканини яєчників. Рівні глутатіону

вважалися низькими ( $n = 34$ ) або високими ( $n = 7$ ) відповідно до порогового значення, яке було визначено як медіана когорти. Рівні глутатіону становили  $73,1 \pm 74,1$  і  $669,1 \pm 339,5$  мкмоль/л у групі з низьким і високим рівнем відповідно (табл. 3). Не було істотної різниці між цими групами за всіма іншими оціненими параметрами (наприклад, вік, тип патології, стадія, тип операції, неoad'ювантна та ад'ювантна хімотерапія).

Щоб оцінити клінічне значення рівнів глутатіону в пухлинній тканині, ми дослідили зв'язок між рівнями глутатіону та прогнозом виживаності при РЯ. Проведено аналіз Каплана-Мейера, а саме, проведено логарифмічно-ранговий тест, який порівнював пацієнтів з високим та низьким рівнями глутатіону пухлини. Показано, що пацієнти з вищим рівнем глутатіону мали значно коротшу виживаність без прогресування (ВВП), ніж пацієнти з нижчим рівнем глутатіону ( $P < 0,01$ ) (рис. 2).

Також визначено, що загальна виживаність (ЗВ) була меншою у пацієнтів з вищим рівнем глутатіону ( $P < 0,001$ ) у тканині РЯ (рис. 3).

Проведено багатофакторний регресійний аналіз Кокса, щоб показати, що рівні глутатіону були незалежними факторами прогнозу. Виявлено, що рівні глутатіону були незалежними факторами як для виживаності без прогресування (КР = 5,330, 95% ДІ: 1,334–21,291;  $P = 0,018$ ), так і для загальної виживаності (КР = 7,174, 95% ДІ: 1,572–32,738;  $P = 0,011$ ) (табл. 4 і табл. 5).

Таблиця 2  
Аналіз експресії рецепторів естрогенів (РЕ $\alpha$ ) та прогестерону (РП) в ракових клітинах яєчників різного ступеня злоякісності

Ступінь злоякісності	Кількість позитивно забарвлених клітин, $M \pm m$	
	РЕ $\alpha$	РП
Низький ( $n = 17$ )	$44,5 \pm 2,3$ (2,5–85,0)	$48,3 \pm 2,8$ (1,5–86,3)
Високий ( $n = 24$ )	$35,6 \pm 4,5$ (2,7–78,3)*	$44,7 \pm 3,7$ (2,1–91,0)

Примітка.

\*  $p < 0,05$  порівняно з низьким ступенем злоякісності.

Таблиця 3

**Характеристики обстежених пацієнток з раком яєчників,  
яким визначали рівень глутатіону**

	Рівні глутатіону		
	низький	високий	P-значення
Випадки (n)	34	7	
Глутатіон, мкмоль/л (середнє ± SD)	72,1 ± 74,1	668,1 ± 339,5	< 0,01
Вік (середнє ± SD), роки	61,0 ± 11,0	61,0 ± 16,5	0,55
Низькодиференційована серозна карцинома	13	5	
Високодиференційована серозна карцинома	1	0	
Світлоклітинний рак	17	1	
Ендометріодна карцинома	1	1	
Муцинозна карцинома	2	0	
Стадія			0,73
I + II	17	3	
III + IV	17	4	
Тип операції			0,85
Повний і оптимальний	30	6	
Інші	4	1	
Неoad'ювантна терапія (доопераційна)			0,82
+	13	3	
-	21	4	
Ад'ювантна терапія			0,41
+	31	7	
-	3	0	

Таблиця 4

**Багатофакторний аналіз виживаності  
без прогресування за регресійною моделлю Кокса**

Різновиди	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	P - значення
Рівні глутатіону	7,174	1,572 – 32,738	0,011
Вік	0,976	0,926 – 1,028	0,354
Вид патології	3,834	0,972 – 15,126	0,055
Стадії	4,440	0,541 – 36,439	0,165
Вид операції	0,170	0,030 – 0,974	0,047
Неoad'ювантна хіміотерапія	3,191	0,660 – 15,437	0,149
Ад'ювантна хіміотерапія	1,049	0,028 – 39,331	0,979

Далі ми провели дослідження *in vitro* з використанням клітин раку яєчників, зосереджені на глутатіоні. Ерастин ідентифікований як інгібітор синтезу глутатіону. Щоб визначити, чи індукуює ерастин пригнічення росту в клітинах раку яєчників, клітини світлоклітинного раку (СКР), ендометріодної карциноми (ЕК), високодифе-

ренційованої (ВСК) та низькодиференційованої (НСК) серозної карциноми обробляли ерастином протягом 24 годин і аналізували життєздатність клітин за допомогою аналізу Premix WST-1 (рис. 4).

Клітини ВСК та ЕК були більш чутливими до ерастину, ніж клітини СКР і НСК.

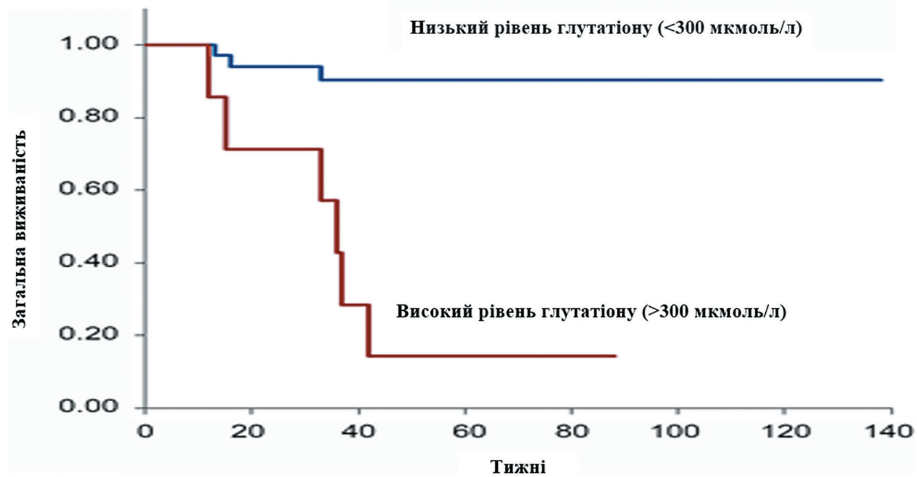
Логарифмічно-ранговий тест  $P < 0.001$ 

Рис. 2. Виживаність без прогресування Каплана-Мейера, визначена за рівнями глутатіону пухлини у пацієнтів з раком яєчників.

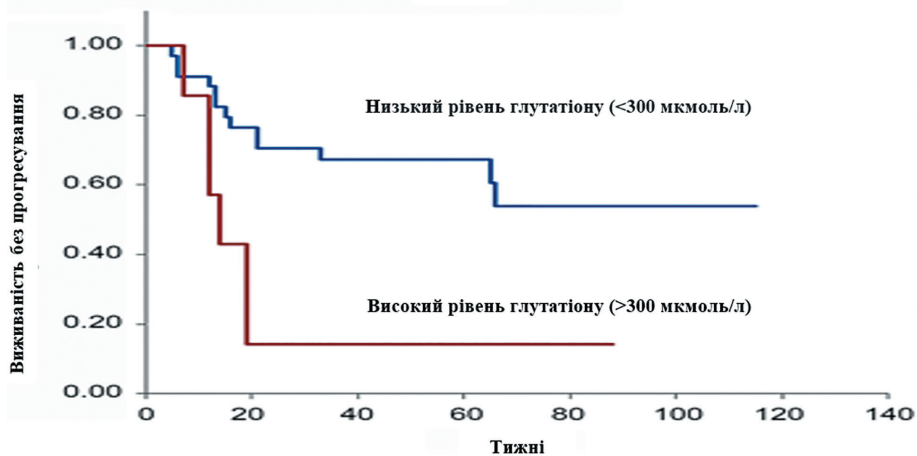
Логарифмічно-ранговий тест  $P < 0.01$ 

Рис. 3. Загальна виживаність Каплана-Мейера, визначена за рівнями глутатіону пухлини у пацієнтів з раком яєчників.

Таблиця 5

## Багатофакторний аналіз загальної виживаності за регресійною моделлю Кокса

Різновиди	Коефіцієнт ризику	95% довірчий інтервал	P - значення
Рівні глутатіону	5,330	1,334 – 21,291	0,018
Вік	0,992	0,953 – 1,032	0,683
Вид патології	3,244	0,839 – 12,539	0,088
Стадії	2,526	0,374 – 17,061	0,342
Вид операції	0,233	0,045 – 1,198	0,081
Неoad'ювантна хіміотерапія	2,833	0,675 – 11,882	0,155
Ад'ювантна хіміотерапія	1,632	0,066 – 40,081	0,764

Виснаження глутатіону викликає накопичення активних форм кисню. Ми порівнювали чутливу до ерастину клітинну лінію світлоклітинного раку яєчників з менш

чутливою клітинною лінією ендометріоїдної карциноми. Клітини СКР і ЕК обробляли ерастином (10 мкМ) протягом 4 годин, і рівні глутатіону аналізували за допомо-



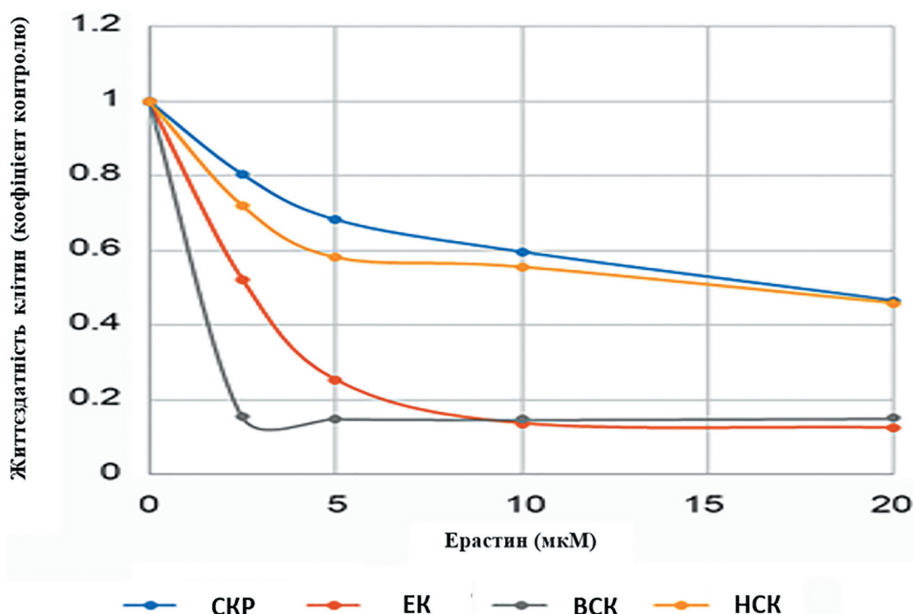


Рис. 4. Чутливість до ерастину в клітинних лініях раку яєчників.

СКР — світлоклітинний рак,  
 ЕК — ендометріоїдна карцинома,  
 ВСК — високо диференційована серозна карцинома,  
 НСК — низькодиференційована серозна карцинома.

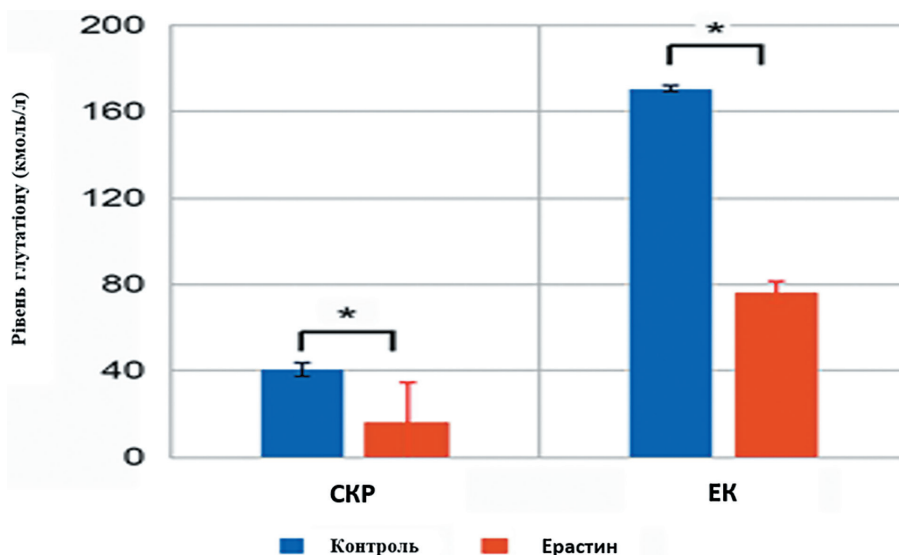


Рис. 5. Рівні глутатіону під впливом ерастину в клітинних лініях раку яєчників.

гою набору для кількісної оцінки GSSG/GSH. Хоча рівні глутатіону були знижені ерастином в обох лініях, рівні глутатіону у клітинах ендометріоїдної карциноми були вищими, ніж у клітинах світлоклітинного раку (рис. 5).

В клітинних лініях, оброблених ерастином, оцінювали АФК за допомогою проточної цитометрії з використанням темночервоного флуоресцентного реагенту. Ми спостерігали, що обробка ерастином призвела до збільшення АФК в обох клітин-

них лініях, але рівень АФК у клітин ЕК був нижчим, ніж у клітин СКР (рис. 6). Ерастин, як і очікувалося, знижував внутрішньоклітинні рівні глутатіону і збільшував АФК, що здатне призводити до загибелі ракових клітин яєчників. Чутливість до ерастину залежала від вихідного внутрішньоклітинного рівня глутатіону.

Існує кілька епідеміологічних факторів, які можуть сприяти розвитку раку яєчників. Вони включають такі спадкові фактори, як сімейний анамнез, наявність мута-

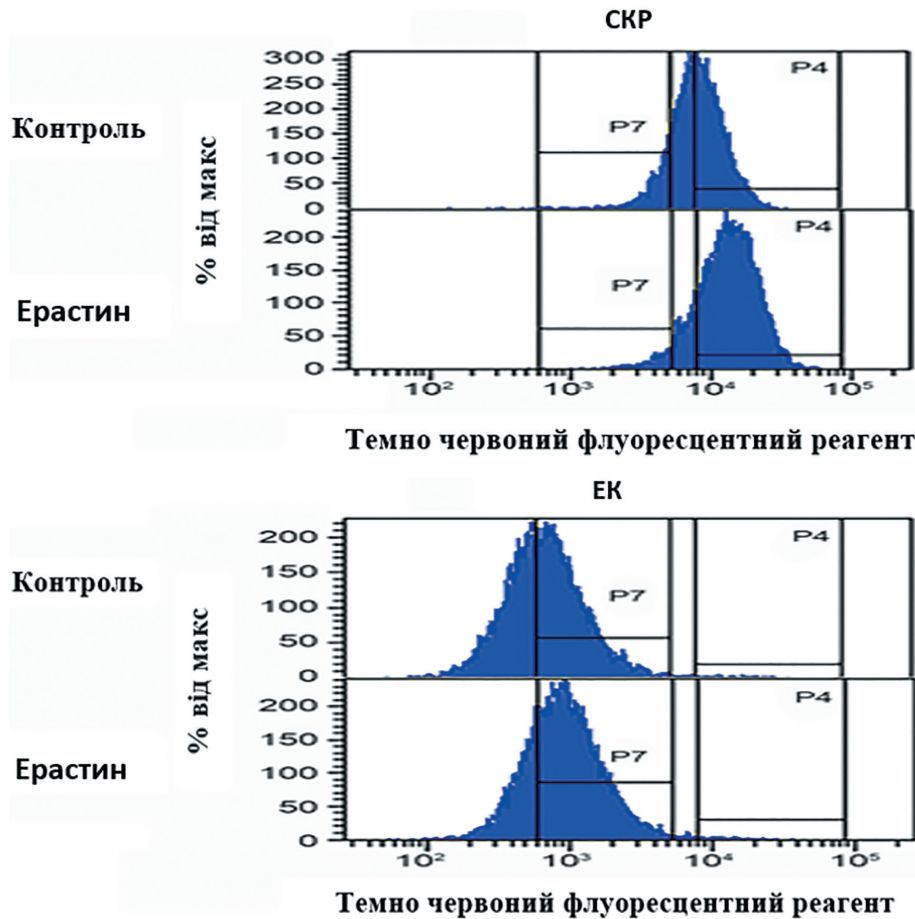


Рис. 6. Рівень АФК під впливом ерастину в клітинних лініях раку яєчників.

цій гена, асоційованого з раком молочної залози (BRCA) 1 і 2, вік, вплив естрогену, наприклад раннє менархе, менопауза після 52 років, а також фактори ризику навколишнього середовища та вибір способу життя, паління сигарет і ожиріння [5]. Усі ці фактори пов'язані з коливаннями репродуктивних гормонів.

Гормональний дисбаланс проявляється збільшенням гонадотропної функції гіпофіза, що призводить до гіперстимуляції овуляції та хронічної гіперестрогенії або зниження секреції прогестерону. Яєчник продукує статеві стероїдні гормони і є тканиною-мішенню для гормонів.

Окислювальний стрес вже давно пов'язаний з розвитком і прогресуванням раку [6], що свідчить про те, що лікування антиоксидантами може забезпечити захист від раку [7]. Серед ферментативних систем, що беруть участь у підтримці внутрішньоклітинного окислювально-відновного балансу, головну роль відіграє глутатіон, який бере участь не лише в системах антиокси-

дантного захисту, а й у багатьох метаболічних процесах [8]. Глутатіон є трипептидом, утвореним глутаміновою кислотою, цистеїном і гліцином. У багатьох нормальних і злоякісних клітинах підвищені рівні глутатіону пов'язані з проліферативною відповіддю та мають важливе значення для прогресування клітинного циклу [9]. З іншого боку, виснаження глутатіону регулює активацію шляхів загибелі клітин [9].

Було опубліковано кілька досліджень про біохімічну функцію глутатіону. Однак його потенційна корисність у клінічній практиці як прогностичного біомаркери невідома.

Ми оцінили зв'язок між рівнями глутатіону та прогнозом пацієнтів з РЯ. Результати наших досліджень свідчать про те, що пацієнтки з РЯ з високим рівнем тканинного глутатіону мали явно нижчі ВВП і ЗВ порівняно з пацієнтами з низьким рівнем глутатіону. Можна припустити, що рівні глутатіону є незалежним фактором для прогнозування ВВП та ЗВ пацієнток



з раком яєчників. Ми дослідили, що підвищені рівні глутатіону призводять до активації систем антиоксидантного захисту, що захищає ракові клітини від загибелі і сприяє розвитку стійкості до ліків. Наші дані показали, що глутатіон пухлини може бути біомаркером для прогнозу пацієток з РЯ. Далі ми продемонстрували дослідження *in vitro* для оцінки окисної системи, пов'язаної з рівнями глутатіону у РЯ. Нещодавно Qi Cheng та ін. [10] повідомили, що ерастин діє синергічно з цисплатином, пригнічуючи ріст клітин РЯ. Ерастин індукував виснаження глутатіону, що призводило до збільшення ліпідних АФК [10]. Зокрема, ерастин інгібує систему Хс, що

призводить до цистеїнового голодування та загибелі ферроптотичних клітин [10].

Наші дані показали, що рівні глутатіону були нижчими в чутливих до ерастину клітинних лініях раку яєчників, ніж у менш чутливих клітинних лініях, а рівень АФК був обернено пропорційним рівням глутатіону в обох лініях клітин. Хоча виснаження глутатіону, індуковане ерастином, призводить до збільшення АФК в обох клітинних лініях, загибелі клітин менш чутливих клітинних ліній раку яєчників немає, оскільки рівень АФК був надто низьким. Показано, що вихідні рівні глутатіону пухлини важливі для оцінки чутливості до ерастину.

## ВИСНОВКИ

Наше дослідження продемонструвало поряд зі значною гетерогенністю розподілу імунопозитивних пухлинних клітин наявність залежності експресії рецепторів стероїдних гормонів від ступеня злоякісності раку яєчників, а саме, у хворих на рак яєчників високого ступеня злоякісності відзначається достовірне зменшення експресії естрогенових рецепторів порівняно з пацієнтками, пухлини яких низького ступеня злоякісності.

Визначено, що високі рівні глутатіону в пухлині значною мірою пов'язані з поганим прогнозом незалежно від інших факторів раку яєчників.

Ерастин призводить до загибелі клітин раку яєчників *in vitro* залежно від рівня внутрішньоклітинного глутатіону. Глутатіон пухлини може бути прогностичним біомаркером виживаності, а ерастин варто вивчити як новий препарат в комплексній терапії раку яєчників.

## ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Ozols RF, Bundy BN, et al. *J Clin Oncol* 2012;21: 3194-3200. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.153>
- Bois A, Lück HJ, et al. *J Nat Cancer Institute* 2013;95: 1320-1329. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg036>
- Heintz AP, Odicino F, et al. *Int J Gynecol Obstet* 2016;5: 161-192. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(06\)60033-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(06)60033-7)
- Markman M, Markman J, et al. *J Clin Oncol* 2014;22: 3120-3125. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.195>
- Roett MA, Evans P. Ovarian Cancer: An Overview. *American Academy of Family Physicians*, 2019;80: 609-616.
- Dixon SJ, Lemberg KM, et al. *Cell* 2012;149: 1060-1672. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Sun Y, Deng R, Zhang C. *J Mol Med* 2020;22: 2826-2832. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11376>
- Franco R, John A. *Antioxidants Redox Signaling* 2012; 17: 1694-1713. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4553>
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. *Nature Rev Cancer* 2013;3: 276-285.
- Sies H. *Free Radical Biol Med* 2020;27: 916-921. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00177-X)

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ГОРМОНАЛЬНОГО РЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСУ  
ТА КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ГЛУТАТІОНУ ПРИ РАКУ ЯЄЧНИКІВ

Фартушок Т.В.<sup>1</sup>, Фартушок Н.В.<sup>2</sup>, Беседін О.В.<sup>1</sup>, Ісаєва К.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,  
м. Львів, Україна;

<sup>2</sup> Львівський медичний інститут, м. Львів, Україна  
fartushok1@ukr.net

**Актуальність.** У структурі жіночої онкопатології рак яєчників займає восьме місце, а серед причин смертності — сьоме місце серед усіх онкозахворювань. В Україні смертність від раку яєчників складає 9,4 на 100 тис. жіночого населення. Щорічно в Україні помирає 24,6% пацієнтів з вперше виявленим раком яєчників. Глутатіон є антиоксидантом, який захищає клітину від токсичності активних форм кисню. Дані показали, що глутатіон може відігравати роль у злоякісних новоутвореннях, включаючи рак яєчників, і, таким чином, метою дослідження стала оцінка клінічного значення тканинного глутатіону і ефекти ерастину (інгібітора синтезу глутатіону) при раку яєчників.

**Матеріали та методи.** Імуногістохімічні дослідження експресії білків проводили на паралельних зрізах з використанням моноклональних антитіл: до рецепторів естрогену — клон 1D5, рецепторів прогестерону — клон PgR636. Систему EnVision, DakoCytomation, використовували для візуалізації білків.

Визначили рівень глутатіону у 41 зразку тканин пухлини раку яєчників. Криві виживаності будували за методом Каплана-Мейера та оцінювали за допомогою логарифмічного рангового критерію. Багатофакторну пропорційну регресійну модель ризику Кокса виконали для виявлення незалежного фактора, що впливає на прогноз виживаності пацієток з раком яєчників. Дослідили ефект ерастину *in vitro* з використанням різних за чутливістю ліній клітин раку яєчників. Оцінили життєздатність клітин, рівні глутатіону і (цитозольну та ліпідну) продукцію активних форм кисню.

**Результати.** Виявлено залежність експресії рецепторів стероїдних гормонів від ступеня злоякісності раку яєчників, а саме, у хворих на рак яєчників високого ступеня злоякісності відзначається достовірне зменшення експресії естрогенових рецепторів порівняно з пацієнтками, пухлини яких низького ступеня злоякісності. Пацієнтки з високим рівнем глутатіону в пухлині мали нижчу виживаність без прогресування і загальну виживаність порівняно з пацієнтками з низьким рівнем глутатіону. Рівні глутатіону пухлини були незалежними факторами для прогнозування виживаності без прогресування та загальної виживаності. Рівень активних форм кисню був обернено пропорційним рівням глутатіону у ракових клітинах яєчників. Вихідні рівні глутатіону були важливими для оцінки чутливості до ерастину. Зменшення рівня глутатіону підвищувало рівні активних форм кисню, що викликало загибель клітин пухлини.

**Висновки.** Визначено, що високі рівні глутатіону в пухлині значною мірою пов'язані з поганим прогнозом незалежно від інших факторів раку яєчників. Ерастин призводить до загибелі клітин раку яєчників *in vitro* залежно від рівня внутрішньоклітинного глутатіону. Глутатіон пухлини може бути прогностичним біомаркером виживаності, а ерастин варто вивчити як новий препарат в комплексній терапії раку яєчників.

Ключові слова: глутатіон, активні форми кисню, рак яєчників.

## PROGNOSTIC VALUE OF HORMONE RECEPTOR STATUS AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF GLUTATHIONE IN OVARIAN CANCER

T. V. Fartushok<sup>1</sup>, N. V. Fartushok<sup>2</sup>, O. V. Besedyn<sup>1</sup>, K. Yu. Isayeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine;*

<sup>2</sup> *Lviv Medical Institute, Lviv, Ukraine*  
*fartushok1@ukr.net*

**Background.** In the structure of female oncology, ovarian cancer ranks eighth among other diseases. Among the causes of death, it ranks seventh among all cancer diseases. In Ukraine, the mortality rate is 9.4 per 100,000 female population. Annually, 24.6% of newly diagnosed ovarian cancer die in Ukraine.

Glutathione is an antioxidant that protects the cell from the toxicity of reactive oxygen species. Data have shown that glutathione may play a role in malignancies, including ovarian cancer, and thus we sought to determine the clinical significance of glutathione and the effects of erastin (a glutathione synthesis inhibitor) in ovarian cancer.

**Materials and methods.** Immunohistochemical studies of protein expression were performed on parallel sections using monoclonal antibodies: against estrogen receptors — clone 1D5, against progesterone receptors — clone PgR636. The EnVision system (DakoCytomation) was used for protein visualization. Ovarian cancer tissues were taken from 41 patients, and the level of glutathione in cancer tissues was determined. Survival curves were performed using the Kaplan-Meier method and evaluated using the log-rank test. A multivariate Cox proportional hazard regression model was performed to identify an independent factor affecting the prognosis of patients with ovarian cancer. The effect of erastin in vitro was studied using ovarian cancer cell lines of different sensitivities. Cell viability, glutathione levels and (cytosolic and lipid) production of reactive oxygen species were assessed.

**Results.** The dependence of the expression of steroid hormone receptors on the degree of malignancy of ovarian cancer was revealed, namely, in patients with ovarian cancer of a high degree of malignancy, there is a significant decrease in the expression of estrogen receptors compared to patients whose tumors are of a low degree of malignancy. Patients with high tumor glutathione levels had lower progression-free survival and overall survival compared to patients with low glutathione levels. Tumor glutathione levels were independent prognostic factors for progression-free survival and overall survival. Baseline glutathione levels were important to assess sensitivity to erastin. Glutathione levels were important to assess sensitivity to erastin. A decrease in the level of glutathione increased the levels of reactive oxygen species, which caused cell death.

**Conclusions.** High tumor glutathione levels were found to be significantly associated with poor prognosis independent of other factors in ovarian cancer. Erastin induces the death of ovarian cancer cells in vitro depending on the level of intracellular glutathione. Tumor glutathione can be a prognostic biomarker of survival, and erastin should be studied as a new drug in the complex therapy of ovarian cancer.

**Key words:** glutathione, reactive oxygen species, ovarian cancer.